

Würzburg, 1959

ÜBER INHALTSSTOFFE DES
ZIEGELROTEN RISSPILZES, INOCYBE PATOULLARDII B R E S.

Auszug
aus der

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur
Erlangung der Doktorwürde
verfaßt und
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität zu Würzburg

LANE LIBRARY. STANFORD UNIVERSITY

vorgelegt von
Helmut Müller
aus
Würzburg

1959

Vorliegende Arbeit wurde im Institut für Pharmazie
und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg
in der Zeit vom 1. Juni 1957 bis zum 1. Mai 1959
von mir ausgeführt und zusammengestellt.

Für die wohlwollende Förderung dieser Arbeit bin ich
Herrn Professor Dr. R. Dietzel zu aufrichtigem Dank
verpflichtet.

Herrn Privatdozent Dr. P. H. List schulde ich beson-
deren Dank für die Anregung und Anleitung zur Bear-
beitung des Themas.

Dem Verein für volkstümliche Pilzkunde, Augsburg,
danke ich für die tatkräftige und selbstlose Mithilfe
beim Sammeln des Untersuchungsmaterials.

Tag der mündl. Prüfung:
Tag der Promotion;

14. 7. 59

Der Ziegelrote Rißpilz, *Inocybe Patouillardii* BRES., der von Anfang Juni bis August in schattigen Parkanlagen, Gärten und Laubwäldern wächst, wurde auf biogene Amine und freie Aminosäuren untersucht. Außerdem wurde ein neuer Weg zur Isolierung von Muscarin ausgearbeitet und Untersuchungen über den roten Farbstoff des Pilzes durchgeführt.

Der Gehalt des Ziegelroten Rißpilzes an Muscarin wird in den meisten Pilzbüchern als 20mal höher als der des Fliegenpilzes angegeben. Diese Zahlenangabe, die von FAHRIG (1) stammt und durch Vergleich der biologischen Aktivitäten ermittelt wurde, hat sich durch die Arbeiten von EUGSTER (2) als viel zu niedrig erwiesen. Je nach Ernte konnte EUGSTER aus dem Rißpilz die 120- bis 380-fache Menge Muscarin isolieren.

Die Geschichte der Konstitutionsermittlung des Muscarins ist nicht zuletzt deshalb so bewegt, weil es lange Zeit nicht gelungen war, dieses Gift rein darzustellen. Die Trennung von dem in seinem chemischen Verhalten sehr ähnlichen Cholin ist auch heute noch schwierig. EUGSTER (2) hat das Muscarin durch Chromatographie der zerlegten Basenreineckate an Zellulosepulver isoliert. Ich konnte nun im Laufe des Trennungsganges der biogenen Amine, wie er in den Schemata I - IV dargestellt ist, eine Fraktion erhalten, die nur aus Muscarin und Cholin bestand. Daraus ließ sich das Muscarin durch präparative Papierelektrophorese nach GRASSMANN und HANNIG (3) rein darstellen. Aus einem geringen Teil der etwa 6 g wiegenden Muscarin-Cholin-Fraktion erhielt ich so 290 mg Muscarinbase, die in das Chloraurat überführt wurde. Das entsprach einer Gesamtmenge von 2,312 g Muscarin, die in 16 kg frischen Pilzen vorlagen. Damit errechnet sich ein Muscaringehalt von 0,014 % für die aus Augsburg stammenden Pilze. Nach EUGSTER hatten die Ziegelroten Rißpilze der Züricher Provenienz einen Gehalt von 0,034 %.

Neben dem Muscarin fand ich noch eine Reihe weiterer Amine, die fast alle bereits früher mehr oder weniger häufig in Pflanzen nachgewiesen worden waren. Neben einem Stoff, der nicht identifiziert werden konnte, sich aber wie ein Purinderivat verhielt, wurde Hypoxanthin nachgewiesen. Als Abbauprodukte des Histidins konnten Histamin und Imidazolyl-4-essigsäure identifiziert werden. An Polymethyldiaminbasen fand ich Putrescin und Cadaverin und schließlich die Verbindungen Cholin und Glykokollbetain.

Die flüchtigen Basen wurden durch Papierchromatographie und Papierelektrophorese analysiert und dabei die Anwesenheit von Methylamin, Dimethylamin, Äthylamin, Colamin, n-Propylamin, i-Amylamin und β -Phenyläthylamin festgestellt. Die im Rißpilz papierchromatographisch nachgewiesenen freien Aminosäuren setzen sich aus Alanin, Prolin, Tyrosin, Valin, Leucin, Cystein, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Histidin, Arginin und Ornithin zusammen.

Durch Ätherextraktion des schwach alkalisierten Pilzextraktes gelang es, den für die Rotfärbung von Bruch- und Druckstellen des Pilzes verantwortlichen Farbstoff zu isolieren. Die Schwierigkeit der Reindarstellung dieses Pigmentes bestand darin, daß es über alle Trennungsversuche hinweg stets mit Phenyläthylamin verunreinigt war. Nach langwierigen Vorversuchen konnte ich schließlich über eine Silberfällung in ammoniakalischem Milieu und präparative Papierchromatographie zum reinen Farbstoff kommen, für den ich die Formel $C_{11}H_{20}N_2O_9$ ermittelte.

Die Eigenschaften des Farbstoffes sind folgende:

1. Als Hydrochlorid gut löslich in Wasser und Äthanol, sehr schwer löslich in Äther und Aceton.
2. Die Base ist aus der wäßrigen Lösung mit Äther zu extrahieren.
3. Die Farbe der sauren Lösung ist rot, die der alkalischen gelb.
4. Bei hoher Wasserstoffionenkonzentration tritt irreversibel Entfärbung ein.
5. BAEYER'sche Probe positiv.
6. PAULY'sche Diazoprobe positiv.
7. Der Farbstoff ist temperaturempfindlich.
8. Beim Versuch, die gelbe freie Base aus ätherischer Lösung durch Abddestillieren des Äthers zu gewinnen, trat Polymerisation ein.
9. Der Farbstoff gibt in alkalischer Lösung schwerlösliche Silbersalze.

Bei der peroralen Applikation einer wäßrigen Farbstofflösung an eine Maus wurde der Farbstoff bereits nach wenigen Minuten mit dem Harn ausgeschieden ^{x)}, wo er durch die auftretende Rotfärbung beim Ansäuern mit Salzsäure und durch

^{x)} Herrn Privatdozent Dr. D. Henschler, Pharmakologisches Institut der Universität Würzburg, danke ich für die Durchführung des biologischen Versuches.

die positive Diazoreaktion leicht nachzuweisen war. Dies scheint für die Erkennung einer Vergiftung mit dem Ziegelroten Rißpilz von Bedeutung zu sein.

Beschreibung der Versuche

16 kg frische Ziegelrote Rißpilze, die im Juni 1958 in den Auwäldern in und um Augsburg gesammelt wurden, legte ich sogleich nach der Ernte in Äthanol ein. Nach etwa 4 Wochen wurden die Pilze vom Konservierungsalkohol getrennt, im Fleischwolf zerkleinert und erneut in frischem Alkohol 1 Woche lang stehen gelassen. Nach Abschleudern der Pilzrückstände auf der Zentrifuge wurden die vereinigten alkoholischen Auszüge schonend im Umlaufverdampfer auf 3 Liter eingengt und die Pilzrückstände nochmals eine Woche lang mit 20 Litern 10%-iger Essigsäure ausgezogen. Auch dieser Extrakt wurde im Vakuum auf ein kleines Volumen eingengt und zunächst getrennt weiter behandelt.

Die Fraktionierung der so erhaltenen Auszüge erfolgte nach den Schemata I - IV.

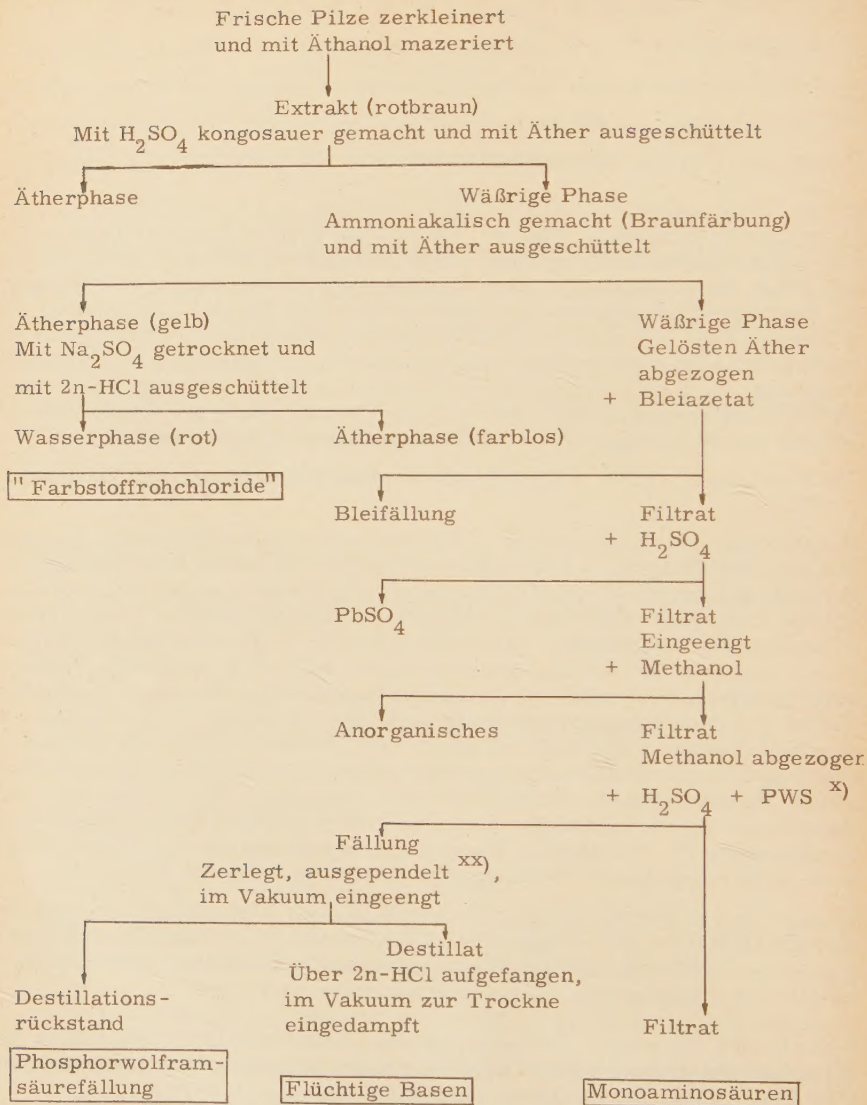
Papierchromatographie: Alle im folgenden beschriebenen Versuche wurden auf Papier S & S 2043 b Mgl ausgeführt. Es wurde stets absteigend chromatographiert. Folgende Lösungsmittelgemische und Sprühreagenzien wurden verwendet: Gemisch I: n-Butanol:Eisessig:Wasser = 6:1:2; Gemisch II: n-Butanol:Eisessig:Wasser = 4:1:5; Gemisch III: n-Butanol:Eisessig:Wasser = 4:1:1; Gemisch IV: wie III, doch das Papier mit 0,2 %iger Natriumazetatlösung gepuffert; Gemisch V: n-Propanol:Ameisensäure:Wasser = 8:1:1, Papier mit 2%iger Dinatriumphosphatlösung gepuffert; Gemisch VI: n-Butanol:Ameisensäure:Wasser = 77:10:13; Gemisch VII: Phenol:Wasser = 80:20 (Gew. Tle.) mit Zusatz von 0,10 ml Ammoniaklösung ($d = 0,91$) für 100 g Lösungsmittelgemisch. Sprühreagens I: DRAGENDORFF's Reagens; Sprühreagens II: Ninhydrinlösung; Sprühreagens III: Sodaalkalische Diazobenzolsulfonsäurelösung; Sprühreagens IV: FEARON's Reagens (4); Sprühreagens V: FOLIN's Reagens. Alle angegebenen Rf-Werte sind Mittel aus mehreren Versuchen.

Papierelektrophorese: Es wurde in einer horizontalen feuchten Kammer gearbeitet und das Papier S & S 2317 benutzt. Als Pufferlösungen wurden verwendet: Puffer I: Pyridin:Eisessig:Wasser = 90:10:900; pH = 6,5. Puffer II: 1,5 n-Essigsäure, 0,3 n-Ameisensäure; pH = 1,5.

Flüchtige Basen: Die nach Schema I erhaltenen flüchtigen Amine wurden papierchromatographisch und papierelektrophoretisch untersucht und mit Hilfe von Vergleichssubstanzen und Sprühreagens II identifiziert.

Papierchromatographische Identifizierung: Rf-Werte für Gemisch IV: Colamin 0,38, Methylamin 0,42, Dimethylamin 0,49, Äthylamin 0,54, n-Propylamin 0,68, i-Amylamin 0,76, β -Phenyläthylamin 0,79. Rf-Werte für Gemisch V: Colamin 0,42, Methylamin 0,47, Dimethylamin 0,55, Äthylamin 0,61, n-Propylamin 0,70, i-Amylamin 0,76, β -Phenyläthylamin 0,80.

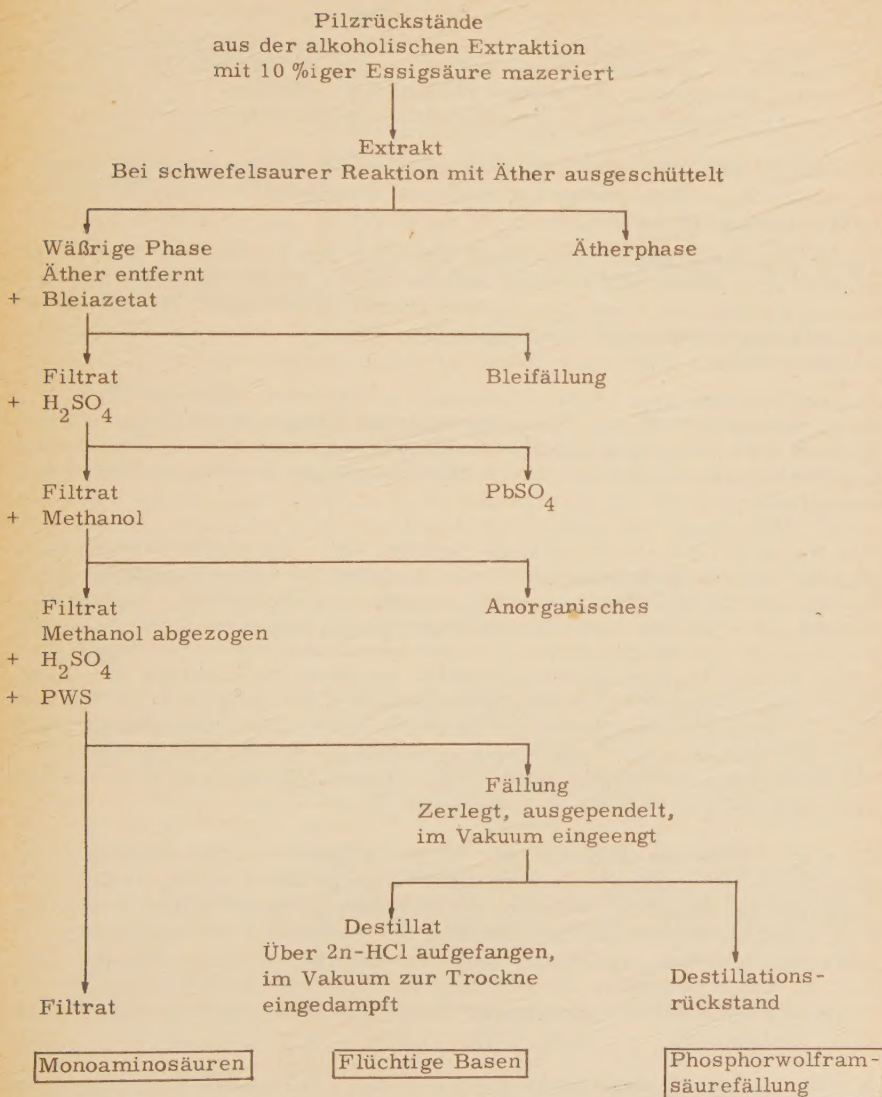
SCHEMA I



^{x)} PWS = Phosphorwolframsäure

^{xx)} Auspendeln = Barium- und Sulfationen exakt entfernen

SCHEMA II



Papierelektrophoretische Identifizierung: Die Vergleichssubstanzen wurden auf die gleichen Streifen neben den flüchtigen Basen aus dem Pilz aufgetragen. Die Laufzeit betrug 4,5 Stunden, die Spannung 340 V, der Elektrodenabstand 35 cm. Wanderungswege in cm für Puffer I: Methylamin 20,1, Dimethylamin 17,2, Äthylamin 16,0, Colamin 14,2, n-Propylamin 14,0, i-Amylamin 11,9, β -Phenyläthylamin 10,6. Wanderungswege in cm für Puffer II: Methylamin 25,5 Dimethylamin 22,2, Äthylamin 19,4, Colamin 17,5, n-Propylamin 17,2, i-Amylamin 14,0, β -Phenyläthylamin 12,2.

Purin-Fraktion: Die nach Schema III erhaltene Purinfraktion konnte wegen der zu geringen Menge nur papierchromatographisch und elektrophoretisch untersucht werden.

Papierchromatographie: Entwickelt wurde mit den Gemischen I und VI. In beiden Fällen wurden die Flecken zunächst im UV-Licht umrandet. Die Anfärbung erfolgte mit Eosin-Quecksilber (5) und Sprühreagens IV. Die so erhaltenen Flecken stimmten mit Hypoxanthin überein. Gemisch I: $R_f = 0,43$. Gemisch VI: $R_f = 0,37$.

Papierelektrophorese: Puffer I, Laufzeit 4,5 Stunden, Spannung 340 V, Elektrodenabstand 35 cm: Wanderungsweg für Hypoxanthin 4,1 cm. Puffer II, Laufzeit 6 Stunden, Spannung 220 V, Elektrodenabstand 35 cm: Wanderungsweg für Hypoxanthin 4,5 cm. Die Anfärbung erfolgte wie bei der Papierchromatographie.

Histidin-Arginin-Fraktion (Schema III): Die papierchromatographische Untersuchung der freien Basen der Histidin-Arginin-Fraktion ergab folgende Stoffe: Histamin, Histidin, Imidazolyl-4-essigsäure, Arginin und Ornithin. Die aus der Fraktion erhaltenen Flecke stimmten in R_f -Wert und Färbung mit den entsprechenden Vergleichssubstanzen überein. Angefärbt wurde mit den Sprühreagenzien II und III. R_f -Werte für Gemisch III: Histamin 0,08, Histidin 0,14, Imidazolylessigsäure 0,25, Arginin 0,13, Ornithin 0,04. - Papierelektrophorese bei Puffer I, 340 V, Elektrodenabstand 35 cm und 4,5 Stunden Laufzeit ergab nach Anfärben mit den Sprühreagenzien II und III folgende Wanderungswege in cm: Imidazolylessigsäure 2,5, Histidin 6,5, Arginin 7,5, Ornithin 9,3, Histamin 13,5.

Lysin-Fraktion (Schema III): Durch Fällung der freien Basen bei ammoniakalischer Reaktion mit gesättigter Reineckesalz-Lösung, Ansäuern des Filtrates und Zusatz von weiterer Reineckelösung, wodurch eine zweite Fällung entstand, wurden aus der Lysinfraktion schließlich ein sogenanntes alkalisches Reineckat, ein saures Reineckat und ein Reineckat-Filtrat erhalten, die durch Behandeln mit Silbersulfat, Entfernen des Silbers und der Sulfationen jeweils wieder in die freien Basen verwandelt wurden. Vgl. Schema IV.

A. Aus dem alkalischen Reineckat wurde durch Dilitursäure-Fällung ein gut kristallisierender Körper erhalten, der nach Umkristallisieren zur Analyse gebracht wurde:

Gef.:	C 33,37 %	H 4,89 %	N 24,54 %	
Ber. für Cadaverin-Diliturat		$C_5H_{14}N_2 \cdot (C_4H_3N_3O_5)_2$	(448,35)	
	C 34,82 %	H 4,50 %	N 25,00 %	
Ber. für Putrescin-Diliturat		$C_4H_{12}N_2 \cdot (C_4H_3N_3O_5)_2$	(434,32)	
	C 33,18 %	H 4,18 %	N 25,80 %	

Das Diliturat wurde mittels Baryt in die freien Basen zerlegt und papierchromatographisch und elektrophoretisch eindeutig als ein Gemisch von Putrescin und Cadaverin erkannt.

Papierchromatographie: Rf-Werte für Gemisch IV (Sprühreagens II): Cadaverin 0,31, Putrescin 0,25. Ein Durchlaufchromatogramm von 72 Stunden Laufzeit trennte die beiden Substanzen deutlicher und ergab völlige Übereinstimmung mit den Vergleichsflecken.

Papierelektrophorese: Puffer I, Spannung 340 V, Elektrodenabstand 35 cm, Laufzeit 4,5 Stunden, Sprühreagens II. Wanderungswege: Cadaverin 19,5 cm, Putrescin 21,0 cm.

Das Filtrat der Dilitursäure-Fällung wurde von überschüssigem Fällungsmittel befreit und eingeeengt. Im Papierchromatogramm zeigten sich 2 Flecken mit DRAGENDORFF's Reagens, die als Cholin und Muscarin erkannt wurden. Rf-Werte für Gemisch I: Cholin 0,25, Muscarin 0,45. Rf-Werte für Gemisch II: Cholin 0,34, Muscarin 0,46. Rf-Werte für Gemisch III: Cholin 0,46, Muscarin 0,59.

Papierelektrophorese: Spannung 340 V, Elektrodenabstand 35 cm, Laufzeit 4,5 Stunden, Sprühreagens I. Wanderungswege für Puffer I: Muscarin 10,3 cm, Cholin 13,5 cm. Wanderungswege für Puffer II: Muscarin 14,5 cm, Cholin 20,0 cm.

Präparative Trennung von Cholin und Muscarin: Aus den zum Sirup eingeeengten freien Basen (5,967 g) wurde eine 5 %ige Lösung in Puffer II hergestellt. 15 ml dieser Lösung, entsprechend 0,75 g Sirup, wurden durch Elektrophorese im ELPHOR V - Gerät nach GRASSMANN und HANNIG in 22 Fraktionen zerlegt. Puffer II, Spannung 220 V, Papier S & S 2040 a, Laufzeit 7 Tage. Die im Vakuum zur Trockne gebrachten Fraktionen wurden mit Gemisch III chromatographiert. Die Fraktionen 7-12 enthielten Cholin, 14-19 Muscarin. Letztere wurden vereinigt und mit Goldchloridchlorwasserstoffsäure gefällt. Es resultierten 780 mg Muscarinchloraurat. Das entspricht 290,6 mg freier Base aus 0,75 g Sirup. Die 16 kg Pilze enthielten somit 2,312 g Muscarinbase.

Analyse von Muscarinchloraurat $C_9H_{20}NO_2 \cdot AuCl_4$ (531,28) :

Ber.:	C 21,06 %	H 3,92 %	N 2,72 %	Au 38,42 %
Gef.:	C 20,96 %	H 3,95 %	N 2,82 %	Au 38,40 %

Fp. = 118 - 121°.

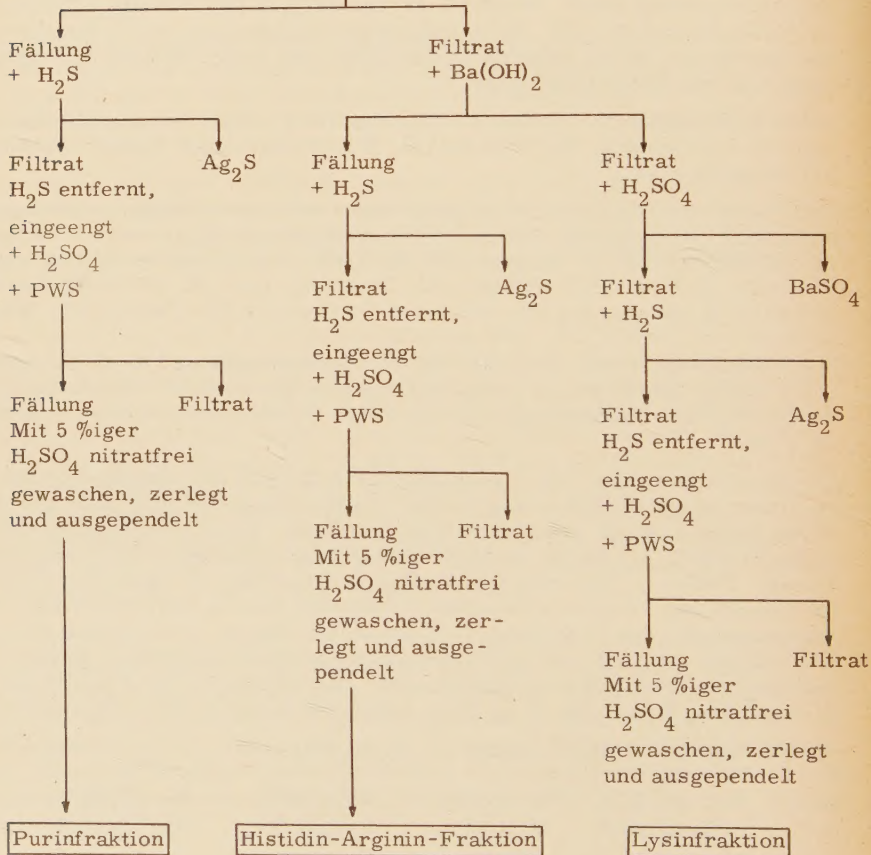
B. Aus dem sauren Reineckat der Lysinfraktion wurden durch Fällung mit Goldchloridchlorwasserstoffsäure 840 mg Glykokollbetainchloraurat erhalten.

SCHEMA III

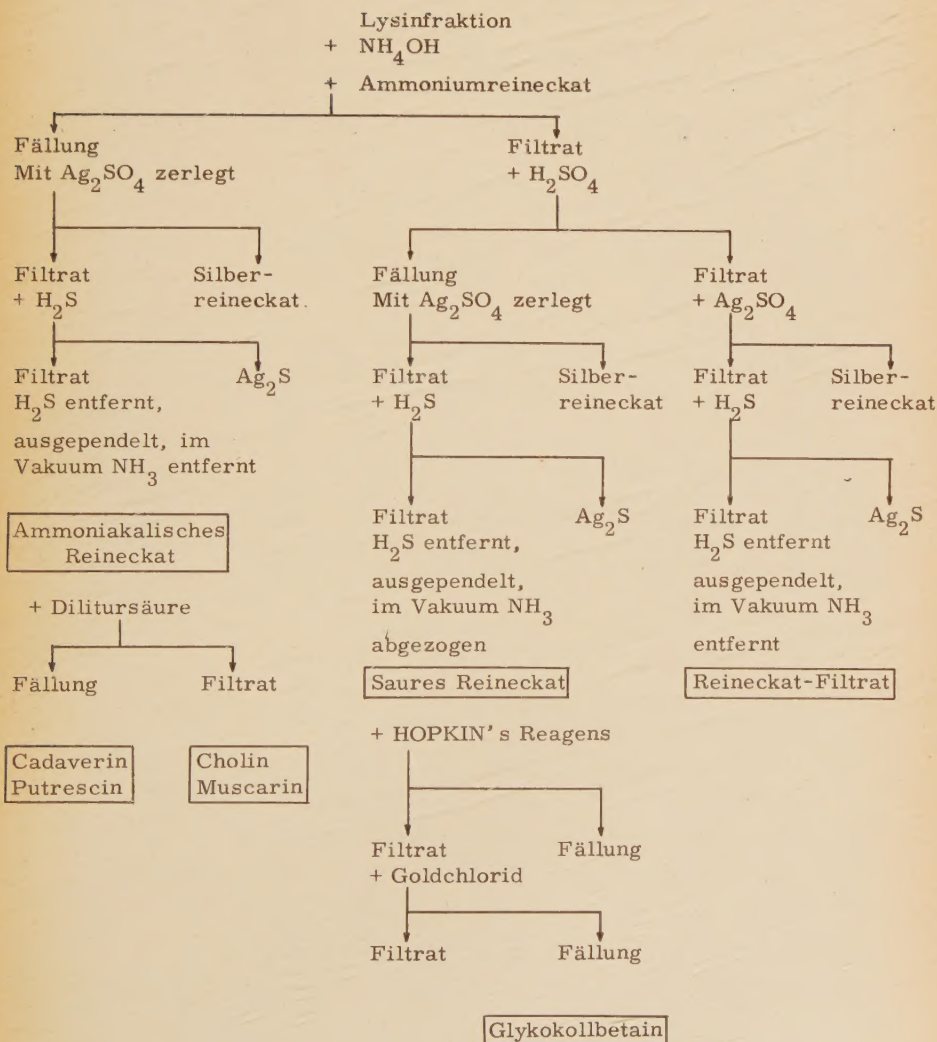
Phosphorwolframsäurefällung aus der äthanolischen Extraktion

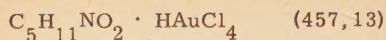
+

Phosphorwolframsäurefällung aus der essigsäuren Extraktion

+ H_2SO_4 + AgNO_3 

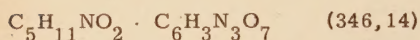
SCHEMA IV





Ber.:	C 13,13 %	H 2,64 %	N 3,06 %	Au 43,14 %
Gef.:	C 12,91 %	H 2,83 %	N 2,99 %	Au 44,26 %

Aus einem Teil des Goldsalzes wurde durch Verreiben mit Silberpulver das Chlorid dargestellt und daraus mit Natriumpikrat das Glykokollbetainpikrat.



Ber.:	C 38,14 %	H 4,08 %	N 16,19 %
Gef.:	C 38,33 %	H 3,96 %	N 16,18 %

Fp. des Chloraurates = 204-209°, Mischschmelzpunkt keine Depression.
Fp. des Pikrates = 180-181°, ebenfalls keine Depression.

C. Im Reineckat-Filtrat wurde schließlich noch Lysin papierchromatographisch nachgewiesen (Sprühreagens II). Rf-Wert für Gemisch I = 0,06, für Gemisch II = 0,08, für Gemisch III = 0,10.

Monoaminosäuren: Die vereinigten Filtrate der Phosphorwolframsäure-fällungen (Schemata I und II) wurden nach EUBEL (6) auf freie Aminosäuren untersucht (Sprühreagenzien II und V). Rf-Werte der mit Gemisch I erkannten Aminosäuren: Alanin 0,23, Prolin 0,28, Tyrosin 0,32, Valin 0,43, Leucin 0,58. Rf-Werte der mit Gemisch VII festgestellten Aminosäuren: Cystein 0,14, Asparaginsäure 0,19, Glutaminsäure 0,28.

Literatur

- 1) FAHRIG, C.: Arch. exp. Path. Pharm. 88, 227 (1920).
- 2) EUGSTER, C. H.: Helv. chim. Acta 40, 886 (1957).
- 3) GRASSMANN, W. u. K. HANNIG: Naturwiss. 37, 397 (1950).
- 4) LIST, P. H.: Z. physiol. Chem. 303, 27 (1956).
- 5) MICHL, H.: Naturwiss. 40, 390 (1953).
- 6) EUBEL, J.: Z. Lebensm. Unters. u. Forsch. 104, 429 (1956).